

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07049

研究課題名(和文)内圧上昇による変性病変形成の分子基盤解析

研究課題名(英文)Analysis of tissue degeneration by internal pressure elevation

研究代表者

伊藤 彰彦 (Ito, Akihiko)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：80273647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：病的な内圧上昇相当の静的水圧を負荷できる細胞培養系において、種々の上皮細胞や神経細胞を培養し、細胞増殖能・細胞形態や細胞骨格系の変化、細胞間接着分子CADM1の発現変化を観察した。上皮細胞は圧負荷により細胞の形が扁平化し体積が増加するとともに、細胞倍化時間が延長した。一方、神経細胞においては、CADM1の細胞外切断(shedding)が亢進し、軸索内にCADM1の細胞内断片が生じ凝集するとともに、軸索の変性が認められた。本断片中のAspに富む領域(25アミノ酸長)を人工的に合成し、生理的食塩水中に放置したところ、LC-MSにてAsp残基のD体化が検出された。本異性化が凝集の一因と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内圧上昇により種々の変性病変が生じるが、その機序は未解明であり、また、根本的な治療法もない。本研究の成果として、内圧上昇の結果、上皮細胞には有意な形態の変化が惹起されるとともに、細胞の増殖も抑制されることが見出された。一方、神経細胞においては、細胞内に蛋白凝集が生じることが明らかとなり、その機序としてアスパラギン酸異性体化(D体化)の関与が示唆された。内圧上昇と密接に関連する代表的な疾患としては緑内障、水頭症、水腎症などが挙げられる。これらの疾患における変性病態を理解する上で、重要な知見が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various epithelial and neuronal cell lines were cultured in the system where cells were loaded with static water pressure comparable with pathogenic elevation of internal pressure, and were examined for changes in cell growth, cell shape, cytoskeletons, and expression of inter-cellular adhesion molecule CADM1. When loaded with pressure, epithelial cells became flat and large in volume, and their doubling time increased. In neuronal cells, CADM1 ectodomain shedding increased, the resulting intracytoplasmic fragment aggregated, and neurite degeneration occurred. The C-terminal portion of this fragment (25-amino acid-long peptide) was synthesized. When this peptide was left in saline, it got D-isomerization in the asparagine residue (LC-MS analysis). This D-isomerization may be one of the causes of peptide aggregation in neurites.

研究分野：実験病理学

キーワード：変性 内圧上昇 接着分子 蛋白凝集 異性体化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19(共通)

1. 研究開始当初の背景

緑内障や水頭症、水腎症などの原因となる内圧上昇には共通の閾値があり、概ね 30 cmH₂O 程度と日常感覚からすると非常に軽微であるが、神経変性や上皮・粘膜変性病変が形成される。報告者は培養液水柱の下、半透過膜上で細胞培養する装置を開発し、初代培養神経細胞は 30 ~ 50 cmH₂O の圧負荷で軸索変性を生じることを見出した。その際、軸索上に発現する IgCAM 型接着分子 CADM1 の細胞外切断が亢進しその細胞内産物(CTF)が軸索内で凝集し、軸索変性の原因となることがわかった。本研究課題では、CTF が軸索内で凝集する機序として L 体アスパラギン酸残基の D 体化(異性体化)の可能性を検証する。種々の上皮細胞を 3 次元培養した後に上記培養装置にて圧負荷を行い、細胞増殖・細胞周期・細胞形態・細胞骨格・細胞間接着分子の変化を解析する。圧負荷に伴う遺伝子・蛋白発現の変化を網羅的に解析する。以上により、軽微な圧が変性病変形成に至る分子基盤の全体像把握を目指す。

2. 研究の目的

内圧の上昇は種々の疾患や病態の原因であり、その病理学的な所見は細胞変性(アポトーシスを含む)・組織変性であるが、その分子機序に関する理解は十分ではない。興味深いことに、変性を惹起する圧は臓器や疾患によらずほぼ一定で約 30 cmH₂O (0.03 気圧)であり、日常の体感からすると軽微な圧である。報告者はこの閾値の意味を知るべく、病的内圧上昇を再現する培養装置を開発した(特許取得済み)。

一方で報告者は、変性・アポトーシスの分子機序として接着分子 Cell adhesion molecule 1(CADM1)の関与を見出している。CADM1 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子で、全身の神経軸索に発現するとともに上皮では肺胞・胆管・尿管などに選択的に発現している。本分子は細胞外領域で酵素的に切断(ectodomain shedding)され、N 末断片と C 末断片(CTF)が産生される。報告者は CTF が細胞内に蓄積すると細胞の変性・アポトーシスが誘導されることを見出し、この機序が肺気腫や特発性間質性肺炎における肺胞上皮変性や糖尿病膵における膵島細胞アポトーシス、腸内圧上昇に伴う腸管神経叢変性などに関与していることを明らかにした。水柱下培養装置でマウス後根神経節細胞を初代培養したところ、30 cmH₂O を越える圧負荷で CADM1 shedding の亢進が生じ、その結果産生される CTF が軸索内で凝集化し、軸索変性の原因となることがわかった。蛋白凝集の機序としてはアスパラギン酸残基の L 体 D 体化(異性体転換)現象が知られ、D 体化しやすいアスパラギン酸残基周辺のアミノ酸配列が同定されており、CTF 中のアスパラギン酸残基に富む領域(ADDAADAD)はその配列によく一致している。

本研究課題では、(1)水柱下培養装置にて 30 ~ 50 cmH₂O 下でマウス神経細胞を初代培養し軸索変性と CTF 凝集を再現し、CTF 凝集の機序として L 体アスパラギン酸残基の D 体化の可能性を検証する。(2)種々の上皮細胞を 3 次元培養した後に水柱下培養装置にて圧負荷を行い、細胞増殖・細胞周期・細胞形態・細胞骨格系・細胞膜分子(CADM1 等の接着分子を含む)の変化を解析する。これら 4 つの現象の相互依存性を解析し、上皮細胞特異的な圧応答機構を明らかにする。(3)圧負荷に伴う遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイ等にて網羅的に解析する。以上により、軽微な圧が変性病変形成に至る分子基盤の全体像把握を目指した。

3. 研究の方法

(1) 圧負荷に対する上皮の応答: 細胞増殖・細胞周期・細胞形態の解析

種々の形態を示す細胞(円柱状の形態を示す上皮細胞: MDCK, Caco-2, AGS, NCI-H441 等; 紡錘状の形態を示す間葉系細胞: NIH3T3, TIG-1 等)を水柱下培養装置にて、様々な水柱高(2, 15, 30, 45 cm 等)下で数日間(1, 2, 3 日等)培養し、細胞増殖速度(倍加時間)、細胞周期(DNA ヒストグラム)を調べる。ファロイジンにて染色し、アクチン線維の走行や密度を計算するとともに細胞形態、細胞体積を測定する。

(2) 圧負荷による神経変性

軸索内の CTF における D 体アスパラギン酸残基の存在検証

マウス神経細胞(後根神経節細胞や上頸神経節細胞)を初代培養し、軸索のネットワークを形成させた後に水柱下培養装置にて 30 ~ 50 cmH₂O の圧を負荷し軸索変性を誘導する(この際 CADM1 の shedding が亢進し、軸索内に CTF の凝集が生じる)。報告者が最近作出した抗 CADM1 CTF N 未認識抗体(ラット単クローン性)を用いた免疫沈降法にて、神経軸索に存在する CTF を濃縮し、液体クロマトグラフ質量分析装置(LC - MS)にて CADM1 CTF 中に D 体化アミノ酸残基が存在するかを調べる(京都大学原子炉実験所との共同研究)。

CADM1 shedding 産物中アスパラギン酸残基 D 体化の検証

CADM1 CTF は -secretase による切断を受け Intracellular domain(ICD)を細胞内に産生する。ICD は 51 アミノ酸長のペプチドで、D 体化が予測されるアスパラギン酸残基はこの ICD の中に存在する。その領域を含むペプチド(25 アミノ酸長)を L 体アミノ酸にて合成する。生理的食塩水中に放置し(水温 50 °C、pH6 ~ 9 の範囲で設定)、LC - MS にて L 体アスパラギン酸が D 体化していないか調べる。

(3) 遺伝子発現の網羅的解析

水柱下培養後の細胞から RNA・蛋白質を抽出し、圧負荷による遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイや RNA sequencing にて検出する。

4. 研究成果

(1) 圧負荷に対する上皮の応答

上皮細胞は圧負荷により細胞の形が扁平化し体積が増加するとともに、細胞倍化時間が延長した。具体例として、腎上皮 MDCK 細胞では、水柱高依存性に細胞倍加時間は約 2 倍にまで延長した(その際、細胞周期の各 phase に arrest は生じなかった)。と同時に、細胞の形態は扁平化して体積は約 1.5 倍になり、アクチン線維密度は低下したが、細胞当たりの総量は不変であった。一方、間葉系細胞では圧負荷にてこれら指標に有意な差は生じなかった。上皮細胞は圧負荷に対して感受性が高い、即ち、傷害を受けやすい直感されるが、その実験的根拠が得られたと言える。

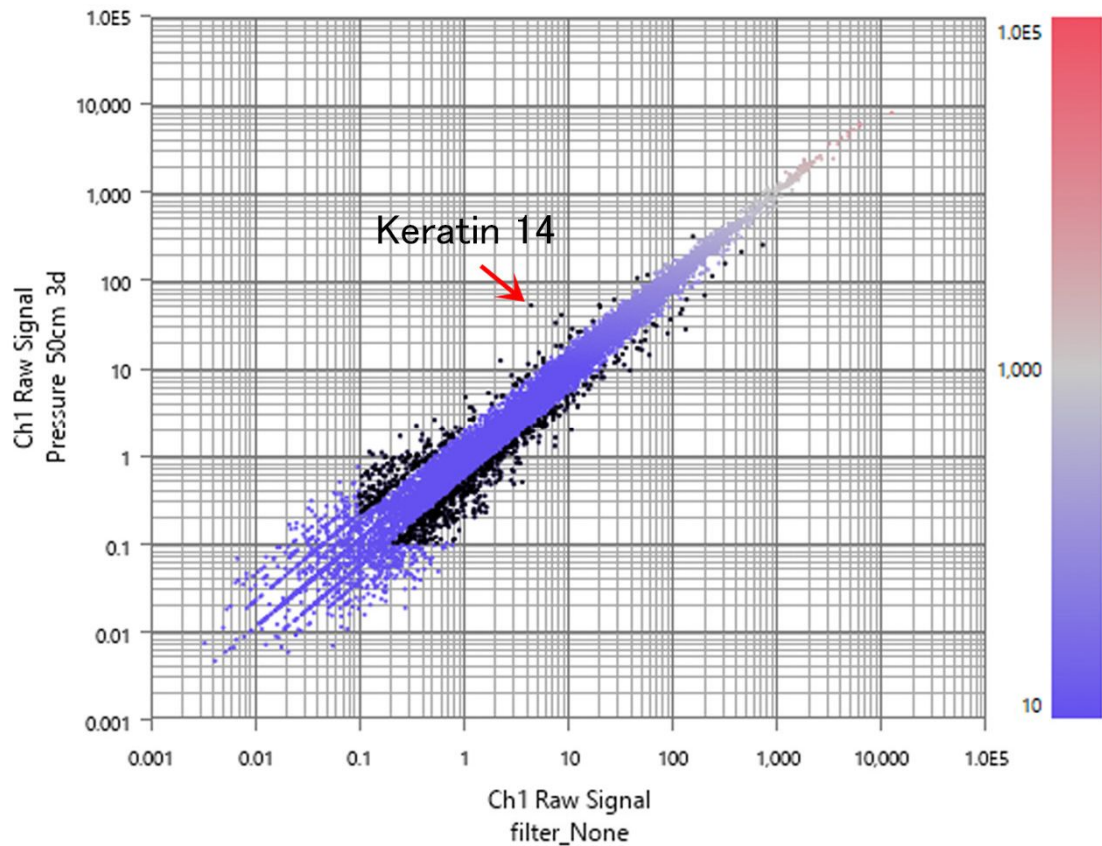
(2) 圧負荷による神経変性

CADM1 ICD のアスパラギン酸に富む領域(25 アミノ酸長)を人工的に合成し、生理的食塩水中に放置したところ、LC-MS にてアスパラギン酸残基の D 体化が検出された。実際に神経細胞内に存在する ICD においてもアスパラギン酸に D 体化が生じているかについては同定するに至らなかった。

以上、CADM1 の shedding 産物が軸索内にて凝集化する機序として、アスパラギン酸残基の異性体化(D 体化)が関与しているとの仮説は支持されたが、証明されるには至らなかった。

(3) 遺伝子発現の網羅的解析

RNA sequencing による遺伝子発現解析では、MDCK 細胞にて、圧負荷によるケラチン 14 の発現上昇 (12 倍) を同定した。免疫染色にて蛋白レベルでの発現上昇を確認した。圧負荷に応答してアクチンの総量は不変であったが、中間径フィラメントにて細胞骨格系が補強される細胞反応と考えられる。



< 考察 >

圧負荷による細胞増殖の抑制は細胞周期の停止を伴わないというユニークな様式をとることが判明した。その詳細な機序は現時点で不明ながら、ケラチン14の発現上昇といった細胞骨格系の補強が細胞増殖を抑制する可能性が考えられ、今後の解明が待たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Azusa Yoneshige, Man Hagiya, Yasutoshi Takashima, Satoru Ueno, Takao Inoue, Ryuichiro Kimura, Yoshiki Koriyama, Akihiko Ito	4. 巻 in press
2. 論文標題 Elevated hydrostatic pressure causes retinal degeneration through upregulating lipocalin-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagiya Man, Kimura Ryuichiro, Yoneshige Azusa, Inoue Takao, Otani Tomoyuki, Ito Akihiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Cell Adhesion Molecule 1 Contributes to Cell Survival in Crowded Epithelial Monolayers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4123 ~ 4123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue T, Hagiya M, Maenishi O, Kimura M, Mizuguchi N, Mine Y, Kimura R, Chikugo T, Itoh T, Satou T, Ito A	4. 巻 237
2. 論文標題 Ectopic TWEAKR expression in type I fiber of stroke-prone spontaneously hypertensive rats is related to slow muscle-specific hypotrophy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 116919-116919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2019.116919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hagiya M, Nakatani Y, Takashima Y, Kato T, Inoue T, Kimura R, Otani T, Sato Y, Mori H, Arima S, Ito A	4. 巻 7
2. 論文標題 Urinary cell adhesion molecule 1 is a novel biomarker that links tubulointerstitial damage to glomerular filtration rates in chronic kidney disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Development Biology	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2019.00111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato Takashi, Hagiya Man, Ito Akihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Renal ADAM10 and 17: Their Physiological and Medical Meanings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2018.00153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Ryuichiro, Yoneshige Azusa, Hagiya Man, Otani Tomoyuki, Inoue Takao, Shiraishi Naoki, Yanagihara Kazuyoshi, Wakayama Tomohiko, Ito Akihiko	4. 巻 213
2. 論文標題 Expression of cell adhesion molecule 1 in gastric neck and base glandular cells: Possible involvement in peritoneal dissemination of signet ring cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 206~213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2018.10.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萩山満、木村竜一郎、伊藤彰彦
2. 発表標題 腎尿細管間質病変の新規バイオマーカー接着分子CADM1 (別名腫瘍抑制因子TSLC1) (Tumor suppressor CADM1/TSLC1 in urine is a novel biomarker of renal tubulointerstitial damage).
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村竜一郎、中畑新吾、萩山満、森下和広、伊藤彰彦.
2. 発表標題 腫瘍抑制因子CADM1/TSLC1は子宮内膜腺上皮においてエストロゲン及び細胞密度依存性に発現する.(Expression of tumor suppressor CADM1/TSLC1 in human endometrial glandular cells dependent on estrogen and cellularity).
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村竜一朗、萩山満、米重あづさ、伊藤彰彦
2. 発表標題 子宮内膜腺上皮における細胞間接着分子CADM1の遺伝子発現制御.(Gene expression of intercellular adhesion molecule CADM1 on endometrial glandular epithelium).
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米重あづさ、上野覚、萩山満、木村竜一朗、郡山恵樹、伊藤彰彦
2. 発表標題 レーザーマイクロダイセクション法による視神経損傷マウス網膜神経節細胞層の単離と遺伝子発現解析.(Early gene expression profile in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury in mice).
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萩山満、木村竜一朗、米重あづさ、伊藤彰彦
2. 発表標題 慢性腎臓病間質病変の新規バイオマーカー接着分子CADM1(Urinary CADM1 is a novel biomarker of tubulointerstitial lesions in chronic kidney disease).
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村竜一朗、萩山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 胃酸産生腺上皮の新規接着分子としてのCADM1の同定：胃印環細胞癌腹膜播種への関与の可能性 (CADM1 as a gastric glandular-cell adhesion molecule and an effector in peritoneal dissemination of signet ring cells)
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩山満、木村竜一朗、伊藤彰彦
2. 発表標題 虚血による接着分子CADM1の細胞外切断亢進と上皮細胞死への関与 (Ectodomain shedding of cell adhesion molecule 1 is involved in epithelial cell death induced by ischemia)
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩山満、木村竜一朗、米重あづさ、伊藤彰彦
2. 発表標題 接着分子CADM1の細胞外切断による尿細管変性：慢性腎臓病間質病変形成への関与 (Tubular cell adhesion molecule-1 shedding causes interstitial lesions in chronic kidney diseases)
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村竜一朗、米重あづさ、萩山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 酸分泌胃粘膜腺上皮の接着分子CADM1が胃印環細胞癌の腹膜播種に寄与する可能性 (Contribution of oxyntic-gland cell adhesion molecule 1 to signet ring cell peritoneal dissemination)
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村竜一朗、萩山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 接着分子CADM1は癌腫の上皮間葉転換における骨芽細胞分化マーカーとして有用
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山満、木村竜一朗、李在俊、伊藤彰彦
2. 発表標題 数10センチ水柱圧による円柱上皮腺癌細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山満、伊藤彰彦
2. 発表標題 内圧上昇による粘膜変性：数10センチ水柱圧で円柱上皮細胞は増殖が抑制される
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Editors: Matsui T, Fujita M, Ito A	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Frontiers	5. 総ページ数 122
3. 書名 Cell Adhesion and Migration in the Development of Multicellular Organisms	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 慢性腎臓病罹患の可能性の判定方法およびリンパ球浸潤スコアを判定する方法	発明者 伊藤彰彦・高島康利・有馬秀二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-077535	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 培養装置及び該培養装置を用いた細胞培養方法	発明者 伊藤彰彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6501255	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

近畿大学医学部病理学講座
<https://www.med.kindai.ac.jp/patho/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------